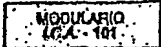


137 101



Mod. CE - 147
Rec'd PTO 12 MAY 2005

3

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

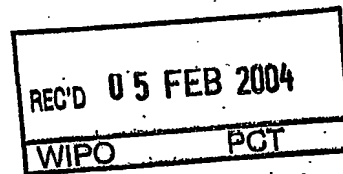
PCT/EP03/12699

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. MI2002 A 002411



Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.



Roma, il 14 NOV. 2003

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

IL DIRIGENTE

Paola Giuliano
Dr.ssa Paola Giuliano

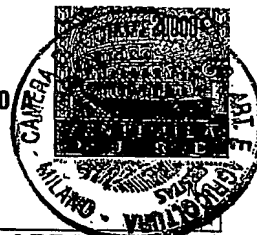
BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE. DEPOSITO RISERVE. ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **BRACCO IMAGING S.p.A.**
Residenza **Milano** codice **07785990156**
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Bianchetti Giuseppe ed altri
cognome nome **Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.** cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza **Rossini**
via _____ n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____
"Agenti per la diagnosi e la terapia di tumori che espongono sulla
superficie delle cellule proteine alterate"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

de Haen Christoph cognome nome
1) _____ 3) _____
2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) _____	_____	_____	____/____/____	<input type="checkbox"/>
2) _____	_____	_____	____/____/____	<input type="checkbox"/>

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.	PROV	n. pag.	25	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 1)	<input checked="" type="checkbox"/>	_____	_____	_____
Doc. 2)	<input checked="" type="checkbox"/>	_____	_____	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3)	<input checked="" type="checkbox"/>	_____	_____	lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4)	<input checked="" type="checkbox"/>	_____	_____	designazione inventore
Doc. 5)	<input checked="" type="checkbox"/>	_____	_____	documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6)	<input checked="" type="checkbox"/>	_____	_____	autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7)	<input checked="" type="checkbox"/>	_____	_____	nomativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

8) attestati di versamento, totale Euro

14 11 2002

COMPILATO IL

CONTINUA SI/NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Bracco

obbligatorio

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO****MILANO**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2002A 002411

Reg. A.

L'anno **DUEMILADUE**il giorno **QUATTORDICI**del mese di **NOVEMBRE**

Il(I) richiedente(i) sopra indicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto di n. _____

fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopralportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

Il rappresentante pur informato del contenuto
della circolare n. 423 del 01/03/2001 effettua
il deposito con riserva di lettera di incarico.

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE
M. CORTONESI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI 2002A 0024

REG. A

DATA DI DEPOSITO

14 NOV 2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ / /

D. TITOLO

"Agenti per la diagnosi e la terapia di tumori che espongono sulla
superficie delle cellule proteine alterate"

L. RIASSUNTO

La presente invenzione ha per oggetto agenti per la diagnosi e la terapia
di tumori che espongono sulla superficie delle cellule proteine alterate.

M. DISEGNO



M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:
mc **"AGENTI PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DI TUMORI CHE
ESPONGONO SULLA SUPERFICIE DELLE CELLULE PROTEINE
ALTERATE"**

a nome : **BRACCO IMAGING S.p.A.**

con sede in: Milano

* * *

M12002A002411
14/11/02

La presente invenzione ha per oggetto agenti per la diagnosi e la terapia di tumori che espongono sulla superficie delle cellule proteine alterate.

SFONDO DELL'INVENZIONE

Alcuni tumori, in particolare tumori gastrici diffusi di origine non famigliare, espongono sulla superficie delle cellule proteine alterate in seguito a mutazioni. E' pensabile che tumori possano esporre proteine alterate per ragioni di modificazione post-traduzionale alterata o per degradazione della proteina.

Una delle famiglie più studiate di proteine alterate esposte sulla superficie di cellule tumorali è quella delle E-cadherine, molecole di adesione cellulare calcio-dipendenti, saldamente ancorate alla membrana citoplasmatica. Sono stati descritti tumori gastrici di tipo sporadico diffuso che esprimono E-cadherine con mutazioni somatiche in corrispondenza degli esoni 8 o 9: tra i tumori con E-cadherina mutata, il 50% circa delle linee cellulari presenta soltanto la mutazione dell'esone 8 e il rimanente 50% presenta soltanto la mutazione dell'esone 9. Tali mutazioni sono specifiche delle cellule tumorali, non essendo assolutamente presenti nelle cellule sane, costituendo pertanto un bersaglio ideale per approcci di immunoterapia.

L'identificazione dei tumori di uno o l'altro tipo invece richiede approcci diagnostici corrispondenti.

US 6,447,776 descrive anticorpi monoclonali in grado di riconoscere selettivamente le forma mutate di E-cadherine. L'uso di tali anticorpi coniugati con alfa-emettitori, in particolare ^{213}Bi , per la radioimmunoterapia locoregionale di tumori murini esprimenti E-cadherine alterate è stato descritto da Senekowitsch-Schmidtke et al., in "Ninth Conference on Cancer Therapy with Antibodies and Immunoconjugates", Abstract 21, Oct.24-26, 2002, Princeton, New Jersey. Gli stessi autori, in una precedente comunicazione (Becker et al., "Molecular Targets and Cancer Therapeutics", Miami Beach, Florida, 29 Ottobre-2 Novembre 2001), hanno proposto l'uso di coniugati di anticorpi monoclonali capaci di riconoscere mutanti di E-cadherine per il trattamento personalizzato di pazienti affetti da tumori caratterizzati da mutazioni somatiche.

Questo approccio, che richiede la preparazione di uno specifico prodotto selettivo per la specifica mutazione riscontrata nella linea tumorale del paziente, può essere promettente in alcuni casi ma è limitato dai problemi di costo connessi allo sviluppo di un farmaco personalizzato. Non è d'altra parte concepibile la somministrazione ad un paziente di una miscela di immunoconiugati diretti verso tutte le possibili forme mutate in quanto le molecole non specifiche per l'unica mutazione delle cellule tumorali del paziente comporterebbero lo svantaggio di un sovraccarico tossicologico e di esposizione a radiazione non giustificato da benefici terapeutici e diagnostici, e perciò inaccettabile e tale da ostacolare l'approvazione regolatoria della miscela di immunoconiugati.

Gli argomenti presentati sono parimenti applicabili ai casi nei quali l'alterazione delle proteine di superficie tumorale è dovuta ad alterate modificazioni post-traduzionali o ad alterata degradazione.

Sono stati descritti anche agenti polivalenti ma con lo scopo principale di migliorare l'avidità dell'agente per il suo bersaglio molecolare o cellulare. Ciò è stato ottenuto ad esempio utilizzando coniugati con più anticorpi o i loro frammenti, o coniugati di più di un polipeptide, ognuno dei quali in grado di riconoscere antigeni o siti proteici distinti contemporaneamente presenti sulla cellula bersaglio oppure semplicemente aumentando il numero delle unità di riconoscimento selettivo per un singolo bersaglio molecolare.

Agenti polivalenti sono anche stati proposti con lo scopo di aumentare la specificità di riconoscimento di un tumore. Questo approccio si basa su una più alta probabilità che il prodotto diagnostico o terapeutico raggiunga un tumore invece di un tessuto sano quando interagisce con due proteine anomale (due siti di legame) simultaneamente presenti sulle cellule tumorali, rispetto a quando reagisce con una sola proteina anomala.

La presente invenzione, a differenza degli approcci sopra illustrati, non mira ad aumentare la avidità o la specificità tissutale di un agente ricorrendo a unità polivalenti. Piuttosto si propone di risolvere il problema del trattamento di pazienti affetti da tumori dello stesso genere ma che si presentano in un ristretto numero di sottotipi, ogni sottotipo tumorale (e paziente corrispondente) essendo caratterizzato dalla presenza di una unica forma alterata di una determinata proteina normale sulla superficie delle cellule tumorali, tale forma di proteina alterata derivando da specifiche alterazioni strutturali della proteina, ad esempio dovute a diverse mutazioni, alterazioni

nella modificazione post-traduzionale o degradazione parziale. L'invenzione propone pertanto un singolo agente polivalente in grado di produrre effetti terapeutici o segnali diagnostici selettivi nei confronti di tutti i sottotipi tumorali senza sovraccarico tossicologico e di esposizione a radiazione per il paziente attribuibile strettamente alla polivalenza. In confronto con un prodotto contenente una sola unità di riconoscimento (prodotto monovalente), il prodotto dell'invenzione è caratterizzato dall'assenza di aumentata avidità per il tessuto tumorale e dall'assenza di una aumentata specificità tumorale rispetto al tessuto sano: ciò non esclude che un elemento di riconoscimento di una forma alterata di una proteina sia composto da sottoelementi ripetitivi.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

L'invenzione fornisce in un suo primo aspetto un agente per la diagnosi o terapia di tumori che espongono sulla superficie delle cellule una sola delle diverse e caratteristiche forme alterate che può assumere una determinata proteina di detto tumore, detta proteina derivando da alterazioni di una forma normale presente nei tessuti sani, detto agente comprendendo:

- a. una unità di riconoscimento composta da una molecola di riconoscimento selettivo di detta forma alterata della proteina coniugata ad almeno un'altra molecola che riconosce una diversa forma alterata della stessa proteina non simultaneamente presente sul tumore;
- b. almeno una unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico coniugata a o compresa in detta unità di riconoscimento selettivo.

L'invenzione ha inoltre per oggetto composizioni diagnostiche



farmaceutiche contenenti un agente come sopra definito in miscela con un veicolo opportuno.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Con il termine di "proteina alterata" si intende di seguito una proteina con una alterazione o modifica di tipo strutturale, come sarà di seguito specificato in dettaglio.

Come molecola di riconoscimento si possono utilizzare, in accordo all'invenzione, anticorpi o loro frammenti capaci di riconoscere e di legarsi selettivamente alle proteine alterate espresse dai tumori.

Sono preferiti in particolare frammenti Fab, F(ab') o scFv. In alternativa, possono essere usati polipeptidi, proteine, polisaccaridi o altre molecole dotate di affinità per dette proteina alterate.

Tali molecole potranno essere coniugate con metodi chimici, ricorrendo a reagenti bifunzionali convenzionali comunemente impiegati nel settore e/o nel caso di immunoglobuline (o loro frammenti) coniugate a proteine (per esempio tossine), per espressione di geni fusi utilizzando tecniche di DNA ricombinante.

Le proteine alterate espresse o esposte dai tumori che possono essere riconosciute dagli agenti dell'invenzione presentano tipicamente una o più mutazioni, alterazioni o assenza di modifiche post-traduzionali oppure effetti di degradazione parziale.

Esempi preferiti di tali proteine alterate sono le proteine definite con la denominazione di E-cadherine che presentano una delezione o nell'esone 8 o nell'esone 9, ognuna delle quali è presente, come sopra riportato, in circa il 50% dei tumori gastrici che esprimono questa famiglia di proteine. Un agente

preferito dell'invenzione sarà pertanto costituito da un anticorpo o frammento di anticorpo contro la E-cadherina con mutazione nell'esone 8 e un secondo anticorpo o frammento di anticorpo contro la E-cadherina con mutazione nell'esone 9, tra loro coniugati e da un'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico, come in seguito specificata.

Detta unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico può essere legata direttamente, tramite un sistema avidina-streptavidina/biotina o tramite un linker opportuno, a una delle unità della molecola di riconoscimento.

Ad esempio, l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico può essere coniugata covalentemente a biotina e, in tal caso, la molecola di riconoscimento sarà coniugata covalentemente ad avidina o streptavidina.

Alternativamente, l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico può essere coniugata covalentemente ad avidina o streptavidina e in tal caso l'unità di riconoscimento sarà coniugata covalentemente a biotina.

Ancora alternativamente, il legame fra unità di riconoscimento selettivo e unità diagnostiche e terapeutiche può essere ottenuto per reazione di gruppi funzionali presenti o introdotti nelle rispettive unità, ad esempio gruppi -SH, OH, -NH₂, -COOH.

La coniugazione delle diverse molecole di riconoscimento fra loro e fra dette unità e l'unità terapeutica o diagnostica può essere ottenuta per reazione fra residui reagenti con gruppi sulfidrilici e i gruppi sulfidrilici presenti su dette unità. Esempi di tali reagenti contengono residui iodoacetile, 2,4-dinitro-

fluorofenile, pentafluorofenile, maleimido e simili.

L'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico, essendo spesso una molecola polifunzionale contenente più dei sopradetti gruppi, può essa stessa fungere da "linker" fra le molecole di riconoscimento selettivo.

L'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico può essere scelta fra chelati di isotopi radioattivi o ioni di metallo paramagnetico, particelle di ossido di ferro, microbolle stabilizzate, composti fluorescenti o fosforescenti, composti assorbenti di radiazione infrarossa vicina, composti citotossici, tossine, composti fotodinamici in grado di generare specie di ossigeno ridotto o di ossigeno singoletto per irradiazione.

L'isotopo radioattivo è preferibilmente scelto fra isotopi di alogeno ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br o ^{82}Br o isotopi radioattivi di altri elementi quali $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{203}Pb , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{161}Tb , ^{72}As , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{52}Fe , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{47}Sc , ^{140}La , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac , ^{223}Ra , ^{224}Ra e ^{227}Th . In alcuni casi lo stesso isotopo permette diagnosi e terapia. Per applicazioni diagnostiche, in particolare per tecniche di Imaging di Risonanza Magnetica (MRI), si utilizzerà un chelato di un metallo paramagnetico scelto fra gli elementi metallici aventi un numero atomico variabile fra 21 e 29, 39, 42, 44, 49 o fra 57 e 83. Preferiti sono i chelati degli ioni metallici Gd^{3+} , Fe^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} , La^{3+} , Yb^{3+} o Mn^{2+} .

Il metallo o l'isotopo sono chelati preferibilmente dai gruppi chelanti derivati della dietilentriammina o da macrocicli poliamminici sostituiti da

gruppi portanti residui carbossilici, fosfonici o solfonici.

I gruppi chelanti possono essere coniugati alla molecola di riconoscimento direttamente o per mezzo di gruppi reattivi del tipo maleimido, bis-maleimido, residui di lisina e simili.

Esempi di composti citotossici sono altresì forniti da residui di noti composti antitumorali, in particolare residui ad attività alchilante quali ciclofosfamide, clorambucile o da tossine naturali o sintetiche.

Per i previsti impieghi terapeutici o diagnostici, gli agenti dell'invenzione saranno opportunamente formulati in forma di composizioni in miscela con un opportuno veicolo.

Le dosi potranno essere determinate dagli esperti del settore sulla base delle caratteristiche di farmacocinetica e tossicologiche dell'agente selezionato, oltre che ovviamente del tipo di applicazione prevista. Sono disponibili inoltre consolidate linee guida che agevolano la determinazione del dosaggio per analogia con gli immunoconiugati e con gli agenti di contrasto paramagnetici già disponibili per applicazioni terapeutiche e diagnostiche. Ad esempio, una volta determinata la quantità necessaria di ione o composto radioattivo o di metallo paramagnetico, sarà di conseguenza determinata, con un semplice calcolo stechiometrico, la quantità dell'agente dell'invenzione. Le composizioni dell'invenzione saranno preferibilmente in forma di soluzioni o sospensioni in veicoli sterili adatti alla somministrazione parenterale, in particolare endovenosa o intramuscolare.

Le composizioni dell'invenzione potranno anche essere in forma di kits comprendenti:

- a. l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto



terapeutico coniugata covalentemente a biotina e

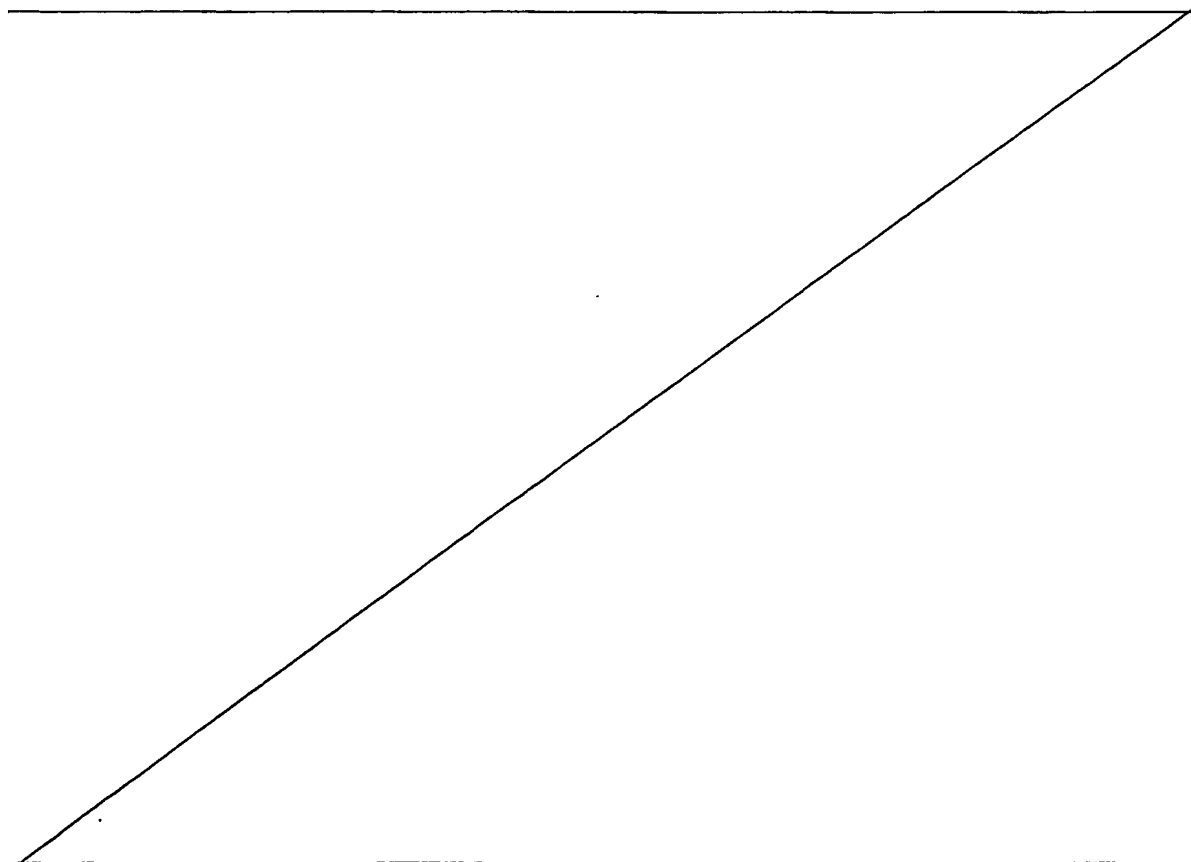
- b. l'unità di riconoscimento coniugata covalentemente ad avidina o streptavidina oppure, in alternativa,
- c. l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico coniugata covalentemente ad avidina o streptavidina e
- d. una unità di riconoscimento coniugata covalentemente a biotina.

In tal caso, la somministrazione separata dei componenti a. e b. permetterà la formazione in vivo dell'agente secondo l'invenzione.

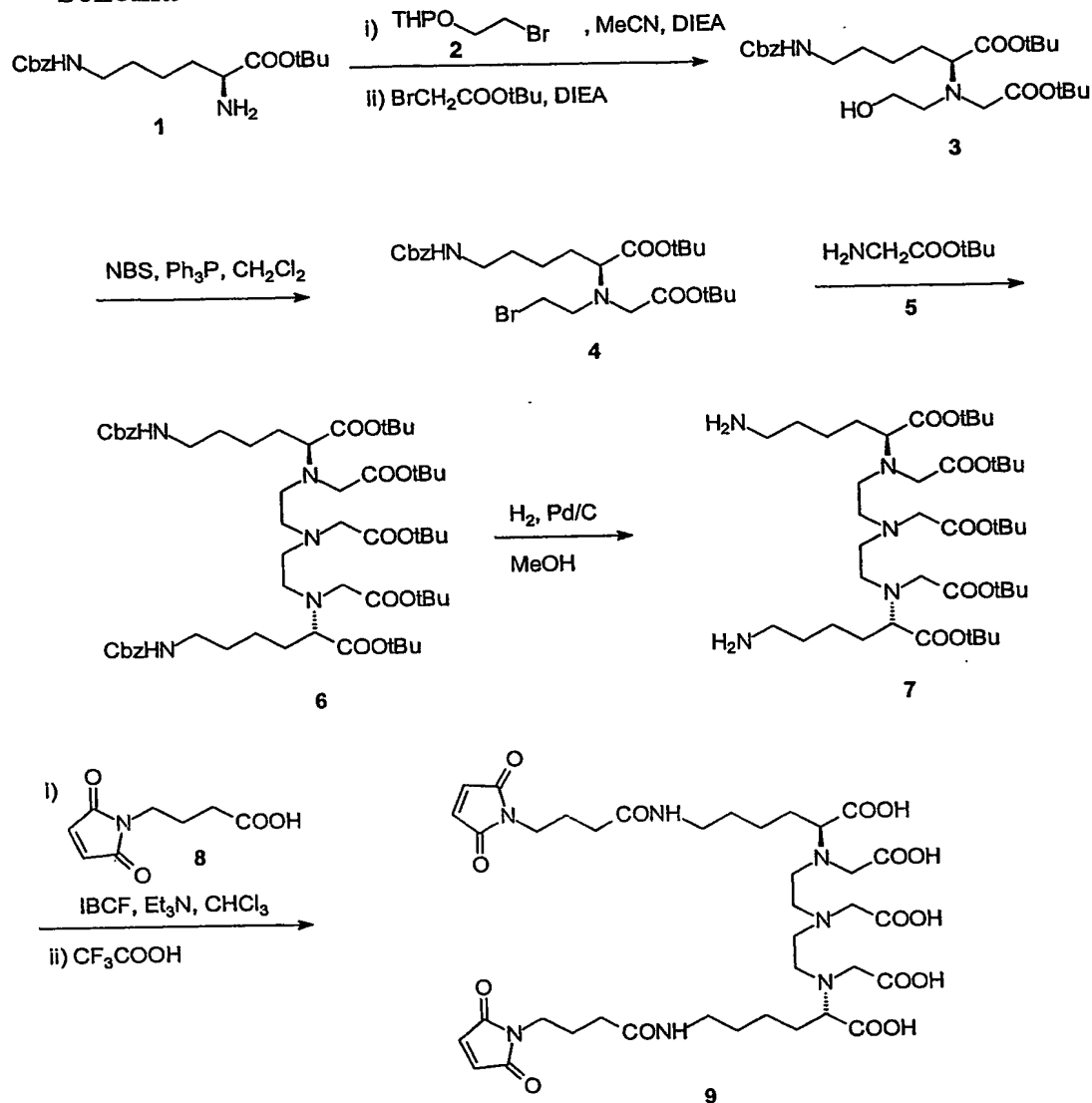
I seguenti Esempi illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

Esempio 1

Sintesi di un bis(maleimido)derivato del DTPA (Composto c9).



Schema



Composto 3

Una soluzione di *N*⁶-[(fenilmetossi)carbonil]-L-lisina *t*-butil estere 1 (preparato secondo *Bioconjugate Chem.* 1999,10,137-140) (100 mmol), 2-(2-bromoetossi)tetraidropirano 2 (preparato secondo *J. Org. Chem.* 1986, 51, 752-755) (135 mmol) e diisopropiletilammia (100 mmol) in MeCN viene mantenuta a riflusso per 14 h. Poi si aggiungono *t*-butil-bromoacetato (120 mmol) e altra diisopropiletilammia (100 mmol) e si mantiene a riflusso la miscela per altre 2 h. La soluzione viene poi evaporata dando un residuo che

viene disciolto in Et₂O e lavato con acqua, HCl 1 N, NaOH 1N e acqua. La soluzione viene evaporata e il residuo viene ridisciolti in MeOH e addizionato di HCl 2N. Dopo avere agitato per 2 h, si aggiunge NaOH 2 N fino a pH 7, poi si evapora la soluzione per eliminare il MeOH, quindi si aggiunge Et₂O per estrarre il prodotto. Si separa la soluzione organica, la si essicca su Na₂SO₄ e la si evapora a dare 3 grezzo che viene purificato via flash-chromatography.

Gli spettri ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS e IR sono risultati consistenti con la struttura indicata.

Composto 4

Si aggiunge *N*-bromosuccinimide (52 mmol), a porzioni, ad una soluzione di 3 (40 mmol) e trifenilfosfina (52 mmol) in CH₂Cl₂ raffreddata a 0°C e sotto agitazione. Si lascia salire la temperatura della soluzione a temperatura ambiente e, dopo 4 h, si lava con acqua, NaHCO₃ al 5% e acqua. La soluzione organica viene essiccata (Na₂SO₄) ed evaporata. Il residuo viene purificato via flash chromatography a dare il composto 4.

Gli spettri ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS e IR sono risultati consistenti con la struttura indicata.

Composto 6

Una miscela bifase di composto 4 (22 mmol) e di cloridrato di *t*-butilestere di glicina 5 (prodotto commerciale) (10,4 mmol) in MeCN e tampone fosfato a pH 8 2 M viene agitata vigorosamente. Dopo 24 h le due fasi sono separate e la fase acquosa è sostituita da tampone fosfato 2 M fresco. Dopo altre 24 h di agitazione, la fase organica viene separata ed evaporata. Il residuo viene purificato via flash chromatography a dare il

composto 6.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS e IR sono risultati consistenti con la struttura indicata.

Composto 7

Pd/C (10%) viene aggiunto ad una soluzione del composto 6 in metanolo e la sospensione viene agitata per 6 h in atmosfera di idrogeno (1 atm; 20°C). La miscela risultante viene filtrata ed evaporata a dare il composto 7.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS e IR sono risultati consistenti con la struttura indicata.

Composto 9

Si aggiunge goccia a goccia e sotto agitazione isobutil cloroformiato (13 mmol) ad una soluzione di acido 4-maleimidobutirrico (composto 8) (12 mmol) e Et_3N (13 mmol) in THF a -15°C e sotto atmosfera di idrogeno. Dopo 30 min si aggiunge goccia a goccia una soluzione del composto 7 (5 mmol) in THF. Dopo altri 30 min a -15°C, la temperatura della miscela di reazione viene fatta risalire a temperatura ambiente e si prosegue l'agitazione per 4 h. Poi si evapora la soluzione, si dissolve il residuo in EtOAc e si lava con acqua. La fase organica viene essiccata (Na_2SO_4) ed evaporata. Si scioglie il residuo in CH_2Cl_2 e si aggiunge CF_3COOH (100 mmol). Dopo 16 h la soluzione viene evaporata, il residuo viene ripreso con CF_3COOH nuovo e la soluzione risultante viene tenuta sotto agitazione per altre 6h. Poi la soluzione viene evaporata e il residuo viene purificato per eluizione resina (Amberlite[®] XAD 16,00T) con un gradiente MeCN/acqua. Le frazioni contenenti il prodotto puro vengono riunite ed evaporate a dare



composto 9.

Gli spettri ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS e IR sono risultati consistenti con la struttura indicata.

Esempio 2

Coniugazione di due differenti frammenti Fab ad un'unica molecola di composto 9 (Composto Fab1-c9-Fab2)

Un volume, V , di una soluzione 2 mM di TCEP viene preparato per diluizione 1 a 250 del prodotto commerciale 0,5 M (Pierce) in un tampone a pH 0 7, de-aerato al massimo, contenente Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM. Poi questa soluzione viene aggiunta ad un volume equivalente, V , di una soluzione 10 mM di un primo frammento Fab ricombinante umano anti *Herpes simplex* (Fab1), preparato secondo Cattani P. *et al.* (1997) e incubato per 30 min a 37°C. Poi mezzo volume ($V/2$) di una soluzione 50 mM di composto 9 in tampone acetato 0,1 M a pH = 5 viene aggiunto e la miscela di reazione viene mantenuta a 37°C per 1h. A questo punto la reazione è completa e, se richiesto, l'eccesso dei reagenti può essere rimosso con tecnologie di separazione assolutamente convenzionali, quali dialisi o gel-filtrazione.

A scopo analitico, un campione è stato iniettato in una colonna di tipo "size exclusion" TSK-G2000SW-XL, dimostrando che la maggior parte della proteina conservava approssimativamente la dimensione di un frammento Fab. Solo una piccola parte mostrava approssimativamente la dimensione di due frammenti Fab. Il prodotto avente la dimensione di un Fab è stato purificato su una colonna size exclusion Sephacryl S-200HR (Amersham Biosciences). Il materiale recuperato è stato purificato ulteriormente su una colonna a

scambio cationico (Resource-S, Amersham Biosciences) ed eluito con un gradiente salino. Il picco corrispondente al coniugato 1:1 del Fab1 col composto 9, (Fab1-c9) viene raccolto e messo da parte.

Un volume, V, di una soluzione 2 mM di TCEP viene preparato per diluizione 1 a 250 del prodotto commerciale 0,5 M (Pierce) in un tampone a pH 0 7, de-aerato al massimo, contenente Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM. Poi questa soluzione viene aggiunta ad un volume equivalente, V, di una soluzione 10 μ M di un secondo frammento Fab (Fab2), specifico per la tossina del tetano, isolato per digestione con papaina di un anticorpo commerciale (Terbutalin, Baxter AG, Vienna), e incubato per 30 min a 37°C.

Poi una quantità molare di Fab1-c9 equivalente a quella del Fab2 ridotto viene aggiunta come soluzione 10 μ M in tampone acetato 0,1 M a pH = 5 e la miscela di reazione viene tenuta a 37°C per 1h.

La miscela di reazione viene separata su una colonna size-exclusion Sephacryl S-200HR viene isolato il materiale con dimensione approssimata equivalente a due frammenti Fab. Il materiale finale, denominato Fab1-c9-Fab2, è risultato omogeneo ad un controllo su colonna size-exclusion analitica TSK G2000SW-XL.

Esempio 3

Coniugato con due differenti frammenti Fab anti E-cadherina mutata (composto Fab3-c9-Fab4)

Frammenti Fab di anticorpo di ratto completamente selettivi per E-cadherine con mutazione sia in esone 8 (Fab3) che in esone 9 (Fab4) vengono preparati secondo Becker et al. (2001) sopra citato. Quest Fab non interagiscono con E-cadherine naturale. Seguendo l'insegnamento

dell'esempio 2, viene preparato il coniugato Fab3-c9-Fab4.

Esempio 4

Marcatura con ^{111}In di Fab1-c9-Fab2

Il coniugato descritto nell'Esempio 2, Fab1-c9-Fab2, è stato formulato alla concentrazione di 0,25 mg/mL in tampone acetato a pH 6. L' ^{111}In cloruro è stato fornito dalla ditta Amersham a concentrazione 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (10 mCi/mL). La marcatura è stata effettuata per incubazione per 30 min a temperatura ambiente. L'efficienza di marcatura è stata verificata mediante cromatografia su strato sottile, con strisce ITLC-SG (Gelman Laboratories), usando come fase mobile una soluzione di NaCl 0,9%.

La miscela di reazione è stata anche analizzata in HPLC mediante cromatografia ad esclusione sterica con colonna TSK-gel G3000; come eluente è stato utilizzato phosphate-buffered saline (PBS) addizionato di NaCl 0,2 M. L'eluato è stato monitorato mediante rivelatore UV alle lunghezze d'onda di 280 e 254 nm e rivelatore radiometrico posto in serie a quello UV. Il radiofarmaco, ^{111}In -Fab1-c9-Fab2, dà un unico picco di radioattività in corrispondenza della proteina non marcata. Con un rapporto molare stechiometrico Fab1-c9-Fab2 / $^{111}\text{InCl}_3$ di 3/1 si è trovato una efficienza di marcatura del 98%.

Esempio 5

Marcatura al ^{177}Lu di Fab3-c9-Fab4

Utilizzando il coniugato Fab3-c9-Fab4 e cloruro di lutezio-177 in proporzioni molari 1: 0.9, la procedura descitta in esempio 4 fornisce un coniugato marcato al lutezio-177. Il prodotto può essere impiegato nella radioimmunoterapia delle metastasi derivanti da un tumore dello stomaco

portante di E-cadherina mutate o in exon 8, o in exon 9. Lo stesso prodotto serve per entrambi le casi senza svantaggio in termini di dose di radiazione rispetto ad un prodotto con una specificità unica per uno o l'altro delle E-cadherine mutate.

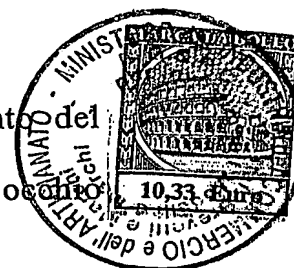
Esempio 6

Scintigrafia di infezione da *Herpes simplex* di un occhio di coniglio con il prodotto dell'Esempio 2 marcato con ^{111}In $^{111}\text{In-Fab1-c9-Fab2}$

In conigli albi adulti, di peso 3 kg, previa anestesia topica con naropina, è stata effettuata una disepitelizzazione corneale del bulbo oculare. Successivamente è stato inoculato il virus mediante instillazione durante 180 min nel sacco congiuntivale di 100-150 μL di soluzione contenente 1×10^6 unità formanti placca di Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1), isolato clinicamente. Dopo 36-48 h in tutti gli animali si è manifestata clinicamente la cheratite sotto forma di ulcera dendritica. Gli animali sono stati quindi seguiti nel tempo clinicamente con visite oculistiche giornaliere per 2 settimane. In nessuno degli animali si sono verificate complicanze.

Per la valutazione scintigrafica è stata utilizzata una gamma-camera portatile ad alta risoluzione spaziale. Il composto $^{111}\text{In-Fab1-c9-Fab2}$ alla dose di 8 $\mu\text{g/kg}$ peso corporeo è stato somministrato a 48 h dall'infezione, quindi la valutazione scintigrafica è stata effettuata a 3, 6, 24 e 48 h dalla somministrazione. Gli animali sono stati quindi sacrificati, con espianto di entrambi i bulbi oculari.

In tutti i tre conigli studiati si è dimostrato un potenziamento del segnale nell'occhio patologico di circa 8 volte superiore rispetto all'occhio



sano; la massima differenza di potenziamento si è dimostrata nelle misurazioni effettuate a distanza di 3 e 6 h, mentre le differenze contrastografiche sono risultate minori nelle misurazioni a distanza di 24 e 48 h.

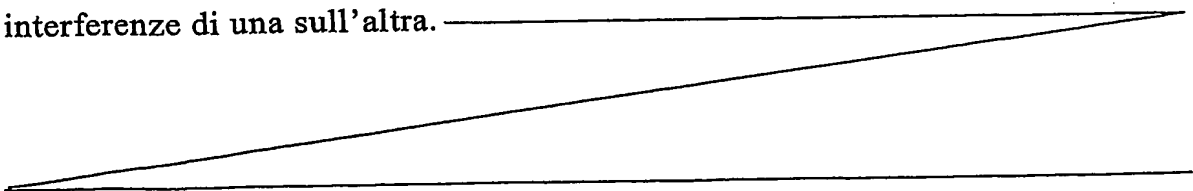
Questa prova in vivo ha quindi dimostrato che il ^{111}In -Fab1-c9-Fab ha le caratteristiche adatte per la visualizzazione di infezioni erpetiche. Inoltre mostra che la presenza della seconda unità elementare di targeting, anti-tossina tetanica nello stesso conjugato non impedisce la funzionalità anti-erpetica.

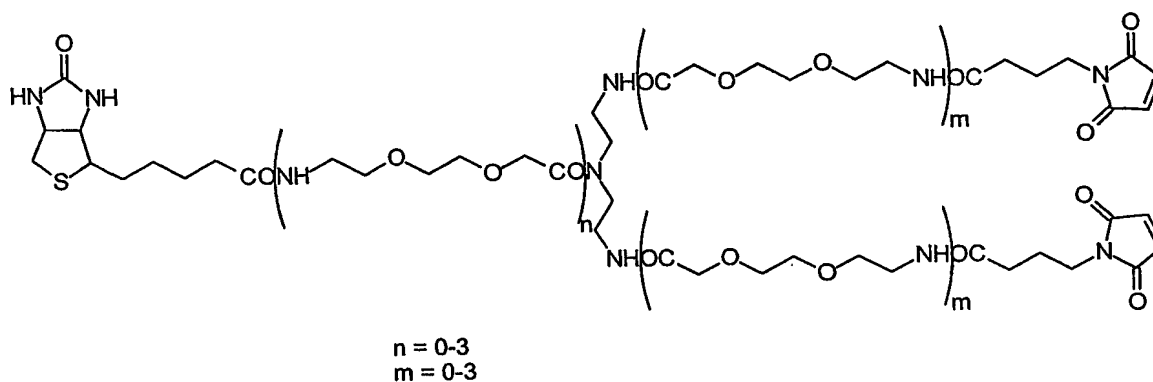
Esempio 7

Dosaggio attività anti-tossina tetanica per il prodotto Fab1-c9-Fab2.

L'attività anti-tossina tetanica è stata determinata utilizzando un kit ELISA commerciale (Tetanus ELISA kit IgG, ICN Diagnostic) in piastra a 96 pozzetti, sostituendo all'anticorpo secondario un anticorpo anti-human Fab coniugato con perossidasi di rafano (Pierce) e visualizzando con substrato colorimetrico TMB (Sigma). L'attività del prodotto Fab1-c9-Fab2 è risultata pari a quella del Fab isolato dalla preparazione di anticorpi di partenza (Tetabulin, Baxter), analizzati ad equivalenti molarità (peso molecolare: circa 49000 per il Fab isolato e circa 100000 per Fab1-c9-Fab2).

Questa prova in vitro dimostra che la funzionalità di entrambi le unità elementari di targeting è mantenuta dopo la coniugazione, senza sostanziali interferenze di una sull'altra.



Esempio 8

Il composto avente la formula sopra riportata con $m=n=1$ è stato preparato a partire da 1,7-Bis(trifluoroacetil)-1,4,7-triazaeptano (preparato secondo *US* 5,514,810) per accoppiamento con acido *N*-*t*-butossicarbonil-8-amino-3,6-dioxaottanoico (*Org. Prep. Proced. Int.* 2002, 34, 326-331) in presenza di HBTU in DMF. Il prodotto ottenuto fu deprotetto con K_2CO_3 in MeOH/ H_2O e la diammina ottenuta fu condensata a *N*-fluorenilmetossicarbonil-8-amino-3,6-dioxaottanoico using HBTU in DMF. Questo prodotto fu deprotetto con piperidina a dare la corrispondente diamina che fu fatta reagire con 2 equivalenti molari di acido 4-maleimidobutirrico *N*-succinimidil estere. Il prodotto ottenuto obtained fu deprotetto con CF_3COOH e poi fatto reagire con biotin *N*-succinimidil estere a dare il prodotto finale.

Esempio 9

Coniugazione di due frammenti Fab differenti ad una singola molecola di composto B, chiamato Fab1-B-Fab2-conjugate 3.

Con metodi preparativi analoghi a quelli descritti nell' esempio 2, ma utilizzando il composto B in sostituzione del composto c9, si ottiene un prodotto con un residuo biotinilico, denominato Fab1-B-Fab2. Questo composto è utilizzabile per la rivelazione e la terapia di lesioni secondo

US5482698.

Esempio 10

Preparazione di una proteina ricombinante di fusione tra Fab ed un frammento di exotossina di Pseudomonas, Toxin-Fab1.

Il plasmide utilizzato per produrre l'anti-*Herpes simplex* Fab umano dell'esempio 2 contiene i cistroni per la catena pesante e quella leggera, sotto controllo di due promotori identici, nell'ordine da 5' and 3'. Seguendo il metodo descritto in US 6,099,842 ed utilizzando normali tecniche d'ingegneria genetica, nel plasmide descritto viene inserito in contiguità al termine del gene codificante la catena leggera una sequenza codificante per un frammento di exotossina di Pseudomonas di peso molecolare 40'000, chiamato PE40. Il plasmide modificato serve per produrre in *E. coli* una proteina ricombinante di fusione tra il Fab originale, Fab1, ed il frammento tossinico PE40, questo costruito viene chiamato Toxin-Fab1.

Esempio 11

Preparazione di un conjugato tra una proteina di fusione tra un Fab ed un frammento di exotossina (Toxin-Fab1) ed un Fab di altra specificità, Toxin-Fab1-D-Fab2.

Seguendo l'esempio 2 viene preparato un conjugato tra il Toxin-Fab1 ed un Fab normale, Fab2, con specificità diversa da quella del Toxin-Fab, ottenendo un prodotto chiamato Toxin-Fab1-D-Fab2. Siccome la fusione di PE40 alla posizione carbossi-terminale della catena leggera può lasciare intatta l'affinità del sito di legame di un anticorpo per il sito target (US6,099,842), Toxin-Fab1-D-Fab2 continuerà a riconoscere le cellule infettate da *Herpes simplex* provocandone la morte.

Esempio 12

Preparazione di un coniugato tra un primo Fab specifico per una mutazione della E-cadherina e fuso con una tossina (Toxin-Fab1) con un secondo Fab specifico per una seconda mutazione della E-cadherina.

Seguendo l'esempio 10 ed utilizzando il sistema utilizzato da Becker *et al.* (2001) per produrre i due diversi Fab anti-E-cadherina mutante in *E. coli* si ottiene una proteina ricombinante di fusione tra Fab selettivo per la E-cadherina mutata nell'esone 8 (Fab3) ed un frammento di exotossina di *Pseudomonas*, PE40, chiamato Toxin-Fab3. Seguendo le procedure descritte in esempio 11, ma utilizzando Toxin-Fab3 e il Fab anti-E-cadherina mutata nell'esone 9 (Fab4), si ottiene un coniugato chiamato Toxin-Fab3-c9-Fab4. Questo prodotto viene utilizzato per la terapia del carcinoma dello stomaco caratterizzato da mutazioni negli esoni 8 o 9 della E-cadherina.

Esempio 13

Radiodiagnosi e radioterapia con i prodotti degli Esempi 3 e 5

Da un paziente con tumore gastrico di tipo sporadico diffuso viene estirpato il tumore primario. Dall'analisi immunoistologica risulta che il tumore espone una E-cadherina con delezione nell' esone 9. Dopo somministrazione del prodotto dell'Esempio 3 marcato con ¹¹¹In analogamente all'Esempio 4 si effettua una scintigrafia che rivela la localizzazione di metastasi e di tumore primario residuo. Allo stesso tempo si ottiene la dosimetria necessaria per la radioimmunoterapia. Il dosaggio ed il tempo di acquisizione d'immagine sono quelle ottimizzate per il peso del paziente. Viene eseguita una terapia radioimmunologica utilizzando il prodotto dell'Esempio 5 in regimi di somministrazioni ottimizzati negli studi clinici necessari per la registrazione del prodotto.



RIVENDICAZIONI

1. Un agente per la diagnosi o terapia di tumori che espongono sulla superficie delle cellule una sola delle diverse e caratteristiche forme alterate che può assumere una determinata proteina di detto tumore, detta forma di proteina derivando da alterazioni di una forma normale presente nei tessuti sani, detto agente comprendendo:
 - a. una unità di riconoscimento composta da una molecola di riconoscimento selettivo di detta forma alterata della proteina coniugata ad almeno un'altra molecola che riconosce una diversa forma alterata della stessa proteina non simultaneamente presente sul tumore;
 - b. almeno una unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico coniugata a o compresa in detta unità di riconoscimento selettivo.
2. Un agente secondo la rivendicazione 1 in cui le molecole di riconoscimento sono scelte fra immunoglobuline o loro frammenti, polipeptidi, polisaccaridi.
3. Un agente secondo la rivendicazione 2 in cui le molecole di riconoscimento sono frammenti Fab, F(ab') o scFv.
4. Un agente secondo la rivendicazione 2 o 3 in cui le molecole di riconoscimento sono coniugate fra loro per mezzo di un legame covalente diretto, di un linker polifunzionale capace di formare legami covalenti con le molecole e/o come risultato dell'espressione di geni fusi.
5. Un agente secondo una o più delle rivendicazioni 1-4 in cui almeno una delle molecole di riconoscimento selettivo riconosce una proteina alterata in

seguito a una o più mutazioni.

6. Un agente secondo una o più delle rivendicazioni 1-4 in cui almeno una delle molecole di riconoscimento selettivo riconosce una proteina alterata in seguito a modifiche post-traduzionali, ad assenza di modifiche post-traduzionali o a degradazione parziale.
7. Un agente secondo una o più delle rivendicazioni 1-6 in cui una delle molecole di riconoscimento selettivo riconosce una E-cadherina con una delezione nell'esone 8 e un'altra molecola riconosce E-cadherina con una delezione nell'esone 9.
8. Un agente secondo una o più delle rivendicazioni precedenti in cui l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico è legata direttamente, tramite un sistema avidina-streptavidina/biotina o tramite un linker opportuno a una delle unità della molecola di riconoscimento.
9. Un agente secondo la rivendicazione 8 in cui l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico è coniugata covalentemente a biotina e la molecola di riconoscimento è coniugata covalentemente ad avidina o streptavidina.
10. Un agente secondo la rivendicazione 8 in cui l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico è coniugata covalentemente ad avidina o streptavidina e la molecola di riconoscimento è coniugata covalentemente a biotina.
11. Un agente secondo una o più delle rivendicazioni precedenti in cui l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico è parte del legame fra le unità della molecola di riconoscimento.
12. Un agente secondo una o più delle rivendicazioni precedenti in cui

l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico è un alogeno radioattivo, chelato di un isotopo radioattivo, un chelato di uno ione di metallo paramagnetico, una particella di ossido di ferro, una microbolla stabilizzata, un composto fluorescente o fosforescente o assorbente di radiazione infrarossa vicina, un composto citotossico, una tossina naturale o sintetica, un composto fotodinamico in grado di generare specie di ossigeno ridotto o di ossigeno singoletto per irradiazione.

13. Un agente secondo la rivendicazione 12 in cui l'alogeno radioattivo è scelto fra ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br o ^{82}Br .

14. Un agente secondo la rivendicazione 12 in cui l'isotopo radioattivo è scelto fra $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{203}Pb , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{161}Tb , ^{72}As , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{52}Fe , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{47}Sc , ^{140}La , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac , ^{223}Ra , ^{224}Ra e ^{227}Th .

15. Un agente secondo la rivendicazione 12 in cui il metallo paramagnetico è scelto fra gli elementi metallici aventi un numero atomico variabile fra 21 e 29, 39, 42, 44, 49 o fra 57 e 83.

16. Un agente secondo la rivendicazione 15 in cui il metallo è scelto Gd^{3+} , Fe^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} , La^{3+} , Yb^{3+} o Mn^{2+} .

17. Un agente secondo una delle rivendicazioni 15 o 16 in cui il metallo o l'isotopo sono chelati da gruppi chelanti derivati della dietilentriammina o da macrocicli poliamminici sostituiti da residui recanti gruppi carbossi, fosfonici o solfonici.

18. Un agente secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 17 in cui la

coniugazione delle diverse molecole di riconoscimento fra loro e fra dette molecole e l'unità terapeutica o diagnostica è ottenuta per reazione fra residui reagenti con gruppi sulfidrilici e i gruppi sulfidrilici presenti su dette unità/molecole.

19. Composizioni farmaceutiche o diagnostiche contenenti un agente delle rivendicazioni 1-18 in miscela con un opportuno veicolo.

20. Composizioni secondo la rivendicazione 19 in forma di kit contenente:

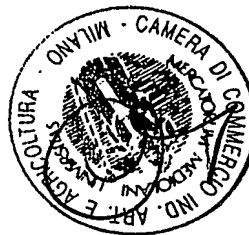
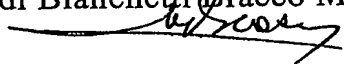
- a. l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico coniugata covalentemente a biotina e
- b. una molecola di riconoscimento coniugata covalentemente ad avidina o streptavidina.

21. Composizioni secondo la rivendicazione 19 in forma di kit contenente:

- a. l'unità in grado di fornire un segnale diagnostico o un effetto terapeutico coniugata covalentemente ad avidina o streptavidina e
- b. una molecola di riconoscimento coniugata covalentemente a biotina.

Milano, 14 novembre 2002

Il Mandatario
(Bracco Mauro)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.